

576.8.097.29:615.78-099

SAXITOXIN

¹Ing. Ladislav STŘEDA, CSc., ²Ing. Viera CÍSAŘOVÁ, ³plk. doc. MUDr. Jiří BAJGAR, DrSc.
¹Úřad pro kontrolu zákazu chemických zbraní, Ministerstvo průmyslu a obchodu ČR, Praha
²Licenční správa, Ministerstvo průmyslu a obchodu ČR, Praha
³Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové
(rektor: plk. doc. MUDr. Svatopluk Býma, CSc.)

Saxitoxin („shellfish poison“, sumární vzorec $C_{10}H_{17}N_7O_4 \cdot 2 HCl$, registrační číslo CAS 35523-89-8) patří do skupiny paralytických mořských neurotoxinů, široce známých jako saxitoxiny a jejich deriváty. Tyto látky jsou produkovány fytoplanktonem (bičíkovci z rodu *Dinoflagellata* - dále jen dinoflageláta -, některé bakterie a řasy), kterými se živí měkkýši. Všeobecně tyto toxiny nemají žádný účinek na měkkýše, ale mohou se akumulovat v jejich tkáních až do úrovně, které jsou toxické vůči organismům vyššího potravního řetězce, včetně člověka. Při požití takto kontaminovaného masa různých druhů měkkýšů (např. Aljašská máslová muška, *Saxidomona gigantea*) vzniká paralytická forma otravy měkkýši („paralytic shellfish poisoning“).

Rovněž korýši, k jejichž potravě patří tyto druhy řas, mohou akumulovat saxitoxin. V neposlední řadě může být saxitoxin produkován i určitými řasami a bakteriemi nacházejícími se v čerstvé vodě, což může vést k její kontaminaci.

Paralytická forma otravy měkkýši je globální problém, který může vzniknout jednak v zemích na pobřeží moří a oceánů, ve kterých je sběr měkkýšů běžný, jednak v zemích, které je ke spotřebě dovážejí. Podle dostupných informací se tyto otravy vyskytly během posledních dvou desetiletí ve více než 30 zemích světa. Počet zaznamenaných projevů intoxikací během posledních 10 let zjevně vzrostl. V mírných zeměpisných šířkách úroveň kontaminace měkkýšů vrcholí koncem jara a počátkem léta, kdy následuje přechod od chladnějších k teplejším podmínkám příznivým pro růst organismů produkujících toxin. V tropech se výskyt paralytické otravy měkkýši shoduje s počátkem období monzunů. Díky dovozům měkkýšů do

různých částí světa může dojít ke kontaminaci kdykoli, bez ohledu na roční období či jiné faktory a neexistuje spolehlivá předpověď, kdy může nastat.

Ekobiologie dinoflagelát

Dinoflageláta se nacházejí ve fytoplanktonu a jsou tedy hojným zdrojem mořské potravy. Jejich rozšíření závisí především na ročním období, intenzitě světla a přítomnosti anorganických prvků v okolním prostředí. Při přemnožení se prozradí červeným zabarvením (přítomnost xantofylu). Občas je možné pozorovat kvetoucí „červené přílivy“, které zabíjejí velký počet ryb.

Forma dinoflagelát je pestrá a závisí na druzích (sférická, mnohostěnná nebo vřetenovitá s hrotovými ústy a zadním zvětšením). Mají 2 bičíky implantované uprostřed těla, přičemž jeden z těchto bičíků je axiální a druhý příčný.

Dvěma nejběžnějšími druhy dinoflagelát vyvolávajícími intoxikaci lidí jsou *Gonyaulax catanella*, která se vyskytuje zvláště na západním pobřeží Severní Ameriky od Kalifornie po Aljašku a na pobřeží japonského souostroví, a *Gonyaulax tamarensis*, která se nalézá na atlantickém pobřeží Severní Ameriky a Evropy. *Gonyaulax catanella* patří do řádu Peridinales, třída Pyrrhophyceae (červené řasy). Také některé ostatní druhy *Gonyaulax*, jako *G. tamarensis* var. *tamarensis*, *G. tamarensis* var. *excavata*, *G. monilata* a *G. polyedra*, které se vyskytují a žijí přibližně ve stejných lokalitách, jsou pokládány za producenty toxinu.

Gymnodinium breve se řadí také k dinoflagelátům. Produkuje toxin způsobující intoxikaci, zvláště

respiračně inhalací kontaminované mořské mlhy a aerosolu v průběhu „červených přílivů“ v Mexickém zálivu a na Floridě.

Saxitoxin se společně s neosaxitoxinem vyskytují také u některých rodů modrých řas (Cyanofyceae). Tato řasa se nachází i v evropských vnitrozemských vodách a v Baltském moři spolu se stejnými toxickými modrými řasami *Microcystis aeruginosa*.

Struktura a vlastnosti saxitoxinu

Saxitoxin je 1H,10H-Pyrrolo[1,2-c]purine-10,10-diol, 2,6-diamino-4-[[[(aminocarbonyl)oxy] methyl]-3a,4,8,9-tetrahydro-, [3aS-(3a.alpha., 4.alpha., 10aR*)]] - (IUPAC). Izolovaný toxin je bílá amorfni hygroskopická látka. Je velmi stabilní v kyselém prostředí. Tyto roztoky vydrží po dobu několika let bez ztráty toxicity. Naopak v alkalickém prostředí, zvláště v přítomnosti kyslíku, je nestabilní.

LC₅₀ saxitoxinu respirační cestou má hodnotu 5,0 mg.min.m⁻³, přičemž účinek se projevuje za 15 minut až 1 hodinu po zasažení. LD₅₀ pro dospělou osobu se odhaduje na 0,05 mg parentální cestou a 0,1 až 0,5 mg při perorálním vstupu. LD₅₀ pro morče je 135 µg/kg, pro myš 263 µg/kg, pro krysu 190 µg/kg a pro opici 364 µg/kg při perorálním podání, 8 µg/kg pro myš a 10 µg/kg pro krysu při intraperitoneálním podání.

Mechanismus účinku a léčení

Mechanismus účinku saxitoxinu je vysvětlován selektivní schopností blokovat sodíkový kanál v buňkách vzrušivých membrán, speciálně na neuromuskulární ploténce, čímž se zabrání výměně sodíkových iontů mezi svalovým vláknem a prostředím a tím depolarizaci svalu. V pokusech na zvířatech výrazně ovlivňuje činnost kardiovaskulárního aparátu, a to dvojím způsobem. Především jde o přímý účinek na autonomní srdeční systém, který se projevuje bradykardií, prodlouženým vedením vzruchů až bloádou ramének. Méně výrazné je působení toxinu na kardiovaskulární centra. Přímý účinek na periferní cévy nebyl prokázán.

K počátečním příznakům otravy saxitoxinem obvykle patří pocit znecitlivění rtů, jazyka a konečků prstů, který se může projevit již během několika minut po průniku jedu do organismu. Příznaky se dále rozvíjejí pocitem znecitlivění končetin a šíje a celkovou svalovou slabostí, poruchou koordinace a vznikem ascendentního typu paralýzy. Smrt je zpravidla zaviněna selháním respiračních svalů a nastává za 2-12 hodin v závislosti na velikosti dávky. Pokud intoxikovaný jedinec přežije prvních 24 hodin, je jeho vyhlídka na uzdravení dosti dobrá. Pozdní následky nejsou uváděny.

I když současné znalosti o mechanismu působení saxitoxinu jsou poměrně rozsáhlé, není dosud

k dispozici žádný specifický účinný antitoxin ani jiné antidotum, a proto se léčení omezuje pouze na ovlivňování jednotlivých symptomů. Největší význam se přikládá umělému či řízenému dýchání, které se musí v závislosti na stupni otravy provádět i dlouhodobě. Je zajímavé a zároveň překvapivé, že léčebné přípravky, které jsou účinné u otravy kurare, např. neostigmin, se u intoxikace saxitoxinu neosvědčily, ačkoli jde o jed s analogickým, tj. kurareformním efektem. U perorálních otrav je indikován včasný výplach žaludku. Pokusy navázat toxin z dinoflagelát na protein a ten použít jako haptén k imunizaci se setkaly pouze s částečným úspěchem.

Metody získávání saxitoxinu

Saxitoxin byl poprvé prokázán ve fytoplanktonu v roce 1935 a poprvé izolován v roce 1957 extrakcí z nálevky měkkýšů „Alaskan butteredum“, *Saxidomus giganteus*, chromatograficky ve slabě bázičném prostředí na Amberlitu IRC 50 a oxidu hlinitém. Tato metoda je stále pokládána za nejlepší způsob získání tohoto druhu toxinu. Saxitoxin je doprovázen neosaxitoxinem, který je hlavně obsažen v *Gonyaulax tamarensis*. Bylo zjištěno, že kromě saxitoxinu a neosaxitoxinu se u některých druhů *Gonyaulax* vyskytují i další strukturálně podobné toxiny, označované jako gonyatoxiny (I-VIII). Tyto toxiny mohou být separovány chromatograficky na tenké vrstvě.

Saxitoxin byl úspěšně syntetizován i chemicky. Toxicita syntetizovaného produktu je poloviční než toxicita přírodního produktu. Složitost této syntézy je srovnatelná s extrakcí z kontaminovaných měkkýšů nebo pěstovaných mikrořas. Pěstování dinoflagelát je dlouhé a obtížné. Cyklus kultivace trvá 5-6 týdnů v mořské vodě staré nejméně jeden měsíc a obsahující 25 g soli na litr. Významný je přídavek vitamínů a dalších substancí. Tato voda je kontaminována symbiotickou bakterií. Na konci pěstování se odštěďováním 5000 litrů vody obsahující kulturu po dobu 3 hodin získá 40 g pevné substance, jejíž extrakcí se získá 90 mg saxitoxinu. Extrakce saxitoxinu z jater měkkýšů poskytuje 4 mg toxinu ze 100 g čerstvého produktu.

Detekce a identifikace saxitoxinu

Vzhledem ke značnému rozšíření paralytické formy otravy měkkýši provádí řada zemí pravidelný monitorovací program k detekci přítomnosti saxitoxinu v měkkýších. Evropská unie má pro tento případ vypracován i mezinárodní regulační požadavek (direktiva EU 91/492/EEC). Monitorovací programy jsou prováděny nejen v zájmu ochrany zdraví spotřebitele, ale i z důvodů ekonomických. Jakýkoli nezdar v provádění efektivního monitoro-

vacího procesu, který by vedl k dodávání toxických produktů na trh, může vést k uzavření oblastí, kde jsou měkkýši sbíráni.

V rámci tohoto monitorovacího programu je v současné době používáno několik biologických a fyzikálně-chemických metod pro kvantitativní stanovení přítomnosti toxinů v měkkýších:

- biologické zkoušení na myších,
- vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC),
- biologická metoda vazby na receptor,
- zkouška imunity,
- testovací soupravy biologického zkoušení.

Biologické zkoušení na myších

Dnes nejrozšířenější autorizovaná metoda pro kvantitativní stanovení paralytické formy otravy měkkýši je biologické zkoušení na myších. Při této metodě je vodný extrakt tkáně měkkýšů injikován myši standardního chovu a jsou pozorovány symptomy intoxikace. Kritériem toxicity je smrt zvířete v závislosti na čase. Jedna myši jednotka je definována jako množství toxinu, který zabije pokusné zvíře za 15 minut. Toto množství může být vyjádřeno ekvivalentem saxitoxin dichloridu, který slouží jako referenční látka pro tento test. K nahrazení tohoto testu byl vyvinut test na moskytech, ale není dosud oficiálně schválen.

Ačkoli je tato metoda považována za efektivní z hlediska své schopnosti stanovit toxicitu pro člověka, není specifickou zkouškou pro svoji vysokou variabilitu (okolo 20 %) a nízkou citlivost. Biologické zkoušení na myších je pracné a nákladné a pravidelně musí být kalibrováno. V neposlední řadě roste i odpor veřejnosti k používání zvířat v programech monitorování toxicity.

Vysokotlaká kapalinová chromatografie

Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC) je testovací metoda přesně stanovující množství toxinů obsažených v intoxikovaných měkkýších. Nevýhoda tohoto testu spočívá v tom, že ačkoli může identifikovat a kvantifikovat každý z přítomných toxinů, nemůže určit jejich kombinované působení na biologický systém. HPLC test nedeteguje toxicitu *per se*, ale spíše koncentrace rozdílných toxinů ve vzorku. Hodnoty toxicity jsou potom připisovány odpovídajícím koncentračním úrovním určeným v testu HPLC, vycházející buď z biologického zkoušení na myších, jestliže je k dispozici, nebo z odhadu. Korelační změny mezi koncentrací toxinu ve vzorku a odpovídajícími toxickými účinky jsou považovány za snadno ovlivnitelné vzhledem k podstatným chybám v biologickém testování na myších. HPLC vyžaduje drahé a technicky složité vybavení, a proto může být prováděna pouze v laboratoři.

Saxitoxin může být stanoven i fluorimetricky, díky jeho rozkladným produktům, po působení směsi NaOH-H₂O₂. Tato metoda je pro saxitoxin velice citlivá. Není použitelná pro neosaxitoxin a při stanovení v surových extraktech v důsledku interferujících fluorescencí.

Biologická metoda vazby na receptor

Tato metoda používá pro detekci toxinů receptor obsahující izolovaný sodíkový kanál. Je to základní laboratorní metoda, která vyžaduje nákladné technicky složité vybavení a radioaktivní (tritiový) saxitoxin jako činidlo. Receptory jsou získávány z mozků krys. Test je podobný biologickému zkoušení na myších, protože deteguje přímo vazbu toxinu na receptor.

Zkoušení imunity

Test zkoušení imunity je založen na užití protilátek, které detegují členy ze skupiny saxitoxinů. V současnosti dostupné protilátky mohou detegovat pouze několik specifických toxinů z této skupiny. Testy zkoušení imunity nejsou proto vhodné pro testování stupně kontaminace měkkýšů, protože může být přítomno několik toxinů ze skupiny saxitoxinů a některé z nich by mohly zůstat nedetegovány.

Testovací soupravy biologického zkoušení

V nedávné době se objevilo na trhu několik souprav založených na metodě biologického testování (reakce antigen-protilátka). Přidáním standardu saxitoxinu nebo roztoku vzorku (extrahovaného z měkkýšů) a enzymem označeného saxitoxinu soutěží volný a enzymem označený saxitoxin v obsazení míst vázaných protilátkou. Užití koncentrace se pohybují kolem 20 µg saxitoxinu/ml (ELISA). Přítomnost saxitoxinu se projeví změnou zbarvení, barevná změna je měřena při vlnové délce 450 nm a koncentrace vypočítána jako funkce absorpce světla. Metoda umožňuje přímé měření toxicity. Použité buňky jsou buňky neuroblastomu zakoupené z banky buněk, tzn. že k udržení banky buněk nejsou utracena zvířata. Minimální detekční limity pro toxiny jsou nižší než v jiných testech; test je považován za 20krát citlivější než testování se živými zvířaty. Další výhody spočívají v tom, že testy jsou reprodukovatelné, soupravy jsou jednoduché při použití v terénních podmínkách, nevyžadují náročný výcvik a metoda umožní rychlé celkové měření toxicity za relativně nízkou cenu. Ačkoli diagnostické testovací soupravy jsou používány v několika laboratořích světa, nebyla tato metoda ještě přijata jako schválený standard. Ověřování

platnosti testů v současné době stále probíhá.

V současnosti jediná zkouška, která je oficiálně uznána na celém světě Společností oficiálních analytických chemiků (Association of Official Analytical Chemists' - AOAC) pro kvantitativní stanovení toxinů v měkkýších, je biologické zkoušení na myších (AOAC, 1990). Většina zemí s pravidelnými monitorovacími programy paralytické formy otravy měkkýšů používá tuto metodu biologického zkoušení, ostatní užívají (neselektivní) spektrofotometrickou metodu nebo HPLC. V poslední době nicméně, roste znepokojení veřejnosti s používáním zvířat v programech monitorování toxicity. Biologickému zkoušení na myších chybí také citlivost a metoda vykazuje značný stupeň variability, takže bylo vynaloženo značné úsilí k vyvinutí alternativních testů. Diagnostické testovací soupravy pro saxitoxin jsou v současnosti podrobeny srovnávacím testům v Evropě a Severní Americe. Jestliže tyto ověřovací testy budou úspěšné, očekává se rychlé rozšíření jejich užití v oficiálních monitorovacích programech. Další výhodou těchto testovacích souprav je možnost jejich použití v terénu. Proto mohou být použity k testování měkkýšů během sběru, při přípravě ke konzumaci nebo k monitorování potenciální kontaminace čerstvé vody.

Všechny tyto testy používané pro stanovení kontaminace měkkýšů toxiny vyžadují vysoce purifikované saxitoxinové standardy pro kalibrační účely. Saxitoxin je rovněž vyžadován v souvislosti s rozvojem výzkumných programů pro potřebu námořní toxikologie, neurotoxikologie, neurofarmakologie atd. Předmětem výzkumu je např. porovnání profilů toxinu, vývoj antidot pro saxitoxin a toxikologický výzkum (zahrnující studie interakce sloučenin s membránovými receptory, např. během studia sloučenin potlačujících bolest nebo mechanismů vztahujících se k neurologickým nemocím, jako je Alzheimerova nebo Parkinsonova nemoc).

Saxitoxin je chemická látka uvedená v Seznamu 1 přílohy chemických látek Úmluvy o zákazu chemických zbraní (Úmluva). Jako takový podléhá opatřením Článku VI Úmluvy a Části VI její Kontrolní přílohy. Tato opatření zahrnují mezi jiným zákaz

vývozu saxitoxinu do nečlenských států Úmluvy, požadavek notifikovat Organizaci pro zákaz chemických zbraní se sídlem v Haagu jakýkoli převod mezi smluvními státy 30 dnů předem a zákaz dalšího převodu mezi smluvními státy. Jakékoli převody jsou povoleny pouze pro výzkumné, zdravotnické, farmaceutické nebo ochranné účely.

V této souvislosti je nutné rovněž zdůraznit, že ve smyslu zákona č. 19/1997 Sb., o některých opatřeních souvisejících se zákazem chemických zbraní, který aplikuje Úmluvu do českého právního řádu, může s chemickými látkami Seznamu 1 (tedy i se saxitoxinem) nakládat pouze právnická osoba, a to pouze na základě licence udělené Úřadem pro kontrolu zákazu chemických zbraní. Tento úřad byl zřízen v rámci Ministerstva průmyslu a obchodu ČR na základě usnesení vlády s působností od 1. listopadu 1995 a jeho úkolem je koordinace veškerých opatření vyplývajících z Úmluvy pro Českou republiku. Vzhledem k tomu, že saxitoxin je potřebný a nezaměnitelný pro tyto účely, i vzhledem k tomu, že jeho pohyb je nutno podrobně monitorovat, se již vyskytl problém s jeho včasným dodáváním. Tyto problémy budou předmětem dalšího sdělení.

Souhrn

V práci jsou shrnuty poznatky o původu, struktuře a vlastnostech saxitoxinu. Je popsáno jeho biologické působení a metody detekce. Současně je upozorněno na problémy, které jsou spojeny s jeho převodem, protože podléhá kontrole v rámci Úmluvy o zákazu chemických zbraní.

Literatura u autora

Klíčová slova: Saxitoxin; Účinek; Detekce.

Do redakce došlo 15. 10. 1998